

計畫編號：CCMP88-RD-033

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

進行性肌肉萎縮症中藥療效之評估—肌胚
細胞培養及動物實驗之研究 (2-2)

委託研究報告

計畫委託機關：私立高雄醫學院

計畫主持人：陳順勝

研究人員：陳贊如 楊淑齡

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

計畫編號：CCMP88-RD-033

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：PG88BO-0005

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

**進行性肌肉萎縮症中藥療效之評估
—肌胚細胞培養及動物實驗之研究**

委託研究報告

計畫委託機關私立高雄醫學院

計畫主持人：陳順勝

研究人員：陳贊如 楊淑齡

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

編號：CCMP88-RD-033

行政院衛生署中醫藥委員會八十八年度
委託研究計畫成果報告

進行性肌肉萎縮症中藥療效之評估-
肌胚細胞培養及動物實驗之研究(第二年)

執行機構：高雄醫學大學神經內科

計畫主持人：陳順勝 教授

研究人員：陳贊如 副教授
楊淑齡 醫師

執行期限：87年7月1日至88年6月30日

進行性肌肉萎縮症中藥療效之評估- 肌胚細胞培養及動物實驗之研究（第二年）

計畫主持人：陳順勝 教授

執行機構：高雄醫學院神經內科

摘要

本研究計畫重點在於嘗試以中藥來治療杜顯型及貝克型肌肉萎縮症 (Duchenne and Becker type muscular dystrophy, 以下簡稱 DMD 及 BMD)。本研究以先天 dystrophin 蛋白缺損小鼠 (MDX) 做為研究材料, 探討生藥中的洋蓐、黨蓐、黃耆、枸杞、川七以及淮山對肌胚細胞生長以及 MDX 小鼠活動量之影響。分析細胞培養之結果, 發現洋蓐、黨蓐、黃耆、川七及枸杞處理後, 均造成促進細胞生長的效果, 而淮山卻無增進細胞生長的效果。在為期 3 個月的中藥投與後, 測量其活動能力, 則經分析後, 發現黨蓐與枸杞可增加垂直活動能力。黨蓐、黃耆、淮山與枸杞具有顯著增進平面活動能力的效果。其中枸杞在垂直活動及平面活動能力測量指標均達顯著的增進效果。於 6 種生藥中, 唯有枸杞可改善 MDX 小鼠活動的表現, 並且亦具有增進肌胚細胞生長的能力。其餘 5 種中藥無法在兩項實驗項目中均獲得改善的目的。

關鍵字：進行性肌肉萎縮症、肌胚細胞培養、活動量記錄

壹、前言

杜顯型及貝克型肌肉萎縮症 (Duchenne type and Becker type Muscular dystrophy, 以下簡稱DMD及BMD)是一種進行性肌肉萎縮無力並會纖維攣縮之疾病，隨著年齡的增加肌力呈現不同程度的喪失，兩者是屬於性連隱性遺傳的先天性肌肉疾病，其臨床上為肌肉變性，壞死，最後死於呼吸衰竭。肌肉病理變化包括肌纖維壞死，肌吞噬，肌溶解，肌纖維呈空影狀，肌纖維再生，細胞浸潤，及結締組織增加。追溯其原因乃X染色體上P21基因缺損而造成dystrophin缺乏所致。Dystrophin是由3685個氨基酸所組成的蛋白質，在DMD為dystrophin完全缺乏，而BMD則為局部缺乏所致(14, 22)。DMD及BMD肌肉萎縮症，dystrophin蛋白的缺乏導因於X染色體上短臂位置P21.1~2.3上面2300kb基因發生缺陷所致，此基因約有79 exons, deletion之部位在exon 45~53最多，目前這個基因cDNA (13.9 kb)廣泛存在於肌肉及腦部之神經細胞內。近二、三年來之研究知道dystrophin蛋白之coding Sequence包括N, Rod及Cysteine-C等三部份，C之構造隨著不同動物種類而不同。兩個dystrophin蛋白形成之dystrophin dimer，接在肌細胞膜之laminin上，另一面則銜接在actin纖維，其功能是在肌纖維收縮後，Sarcomere恢復原來長度時，使肌細胞膜亦可恢復原來之舒張狀態。當Dystrophin基因發生deletion時，即缺乏正常之dystrophin來維持肌細胞膜之安定，使肌細胞膜處於過度收縮狀態，致使肌細胞壞死(1, 9, 31)

進行性肌肉萎縮症之實驗動物有多種，其中以具有dystrophin缺陷的MDX (Murine Muscular Dystrophy) 小鼠是常被使用。MDX小鼠在出生二週後，會出現肌肉壞死現象，隨後會有肌細胞增殖及局部纖維化，真正明顯的變化要到相當年齡之後才會發生(5)，其疾病的表現因此不是很明顯，但由免疫組織化學染色卻可輕易證明其異常(31)，因此MDX小鼠是常用於研究DMD時使用的實驗動物。

杜顯型及貝克型肌肉萎縮症及實驗動物模式之治療方法

目前DMD之治療方法包括：1. 腎上腺素療法 (steroid therapy)；2. 肌胚細胞移植 (myoblast transplantation)；及3. 基因療法 (gene therapy)，基因療法又分：基因直接注射療法；肌胚細胞誘導 (myoblast-mediated) 基因療法；及病毒誘導 (virus-mediated) 基因療法(33,35)。而在本計畫中藥治療將是一新的嘗試，將以中藥直接治療或配合肌胚細胞移植或基因療法進行之。

對DMD及BMD目前尚無有效的治療法，理論上有可能對症治療的方

法為矯正基因缺陷或補充缺乏之dystrophin蛋白，目前較廣被接受的是以細胞療法(18,21,23,24,25,26)為主，基因療法尚在研究中。正常肌細胞在其肌纖維周圍有衛星細胞(Satellite cell)具再生成熟肌細胞的能力，以補充壞死的肌纖維。且因具有融合(fusion)能力，可與其它肌細胞融合成成熟肌細胞，故肌胚細胞(myoblast)移植療法就是取正常肌纖維，在實驗室中大量培養然後移植到DMD病患肌肉，使之與病肌融合後，正常肌細胞的基因提供dystrophin來改善病肌缺陷，目前已有小鼠及人類的臨床試驗(28)皆可見功能上及形態學上的進步。是以肌胚細胞療法是一項值得一試的治療方法。但是細胞療法仍有許多待解決之困難處，如病人之選擇、細胞移植的最佳時機、細胞培養技術的建立、移植後的組織排斥現象(25)等等，針對這些目前尚待改進及在基礎醫學或臨床上有爭論之處。由於基因療法的技術難度高，目前尚在研究中。

動物肌胚細胞移植實驗模式

本模式之重點在於肌胚細胞的培養及繼代可大量供應移植所需之細胞，以供給DMD或BMD患者使用，已成目前治療DMD及BMD病症之一線希望。因此若能在本研究中對移植技術與評估方法做更進一步的改進，必能使臨床應用更為彰顯其效果，故本研究的重要性不僅是在實驗室內可提供肌細胞培養的改善方法，瞭解DMD及BMD之致病分生機轉，同時在臨床應用上也可提供更佳的移植模式，都將帶給DMD及BMD患者莫大的福祉。

肌胚細胞的培養由早期培養雞胚肌胚細胞(myoblast)，及人類胚胎肌胚細胞(11,12,13)，到用於成人肌胚細胞培養(3)皆有不錯的效果。至此肌胚細胞培養已成一標準的培養程序(10)。至目前為止許多人仍在進行更進一步的研究，以改善肌細胞培養技術及培養效果(26)。究竟那一種條件下比較易於培養且能培養出較利於移植的肌胚細胞？

過去三年來我們的實驗室已建立肌胚細胞移植模式，自蘇格蘭進口並繁殖成功MDX小鼠，並作其肌胚細胞培養成功。目前常規從2~3天大的小鼠取其上、下肢的成肌細胞培養；以10%FBS-DMEM培養，其細胞數目倍增時間約為35小時，經Desmin免疫細胞染色法鑑定為成肌細胞。

我們擬進一步嘗試以中藥改善肌胚細胞培養之濃度與效果。

人體進行性肌萎縮症病人肌胚細胞移植之研究

新近研究報告顯示肌細胞移植可能對肌原性肌萎縮病人之治療有所助益，引起病人、家屬及醫師之廣泛性興趣 (27)。主要是DMD及BMD病人由於X染色體P21基因之缺陷，造成Dystrophin蛋白質之缺乏，移植入正常肌胚細胞後，正常肌胚細胞會與病人基因有缺損之細胞融合，帶入正常之基因後，而使肌細胞有能力製造dystrophin蛋白。在人體移植後，經由肌肉切片之證明，的確可產生上述之效果。但在肌肉運動功能上，除了Peter Laws之實驗資料顯示有所改善外，其他尚無一致結論，有待進一步證實之必要。

DMD患者和正常人的骨骼肌在培養時，DMD細胞活力較低，兩組的肌胚細胞於光鏡下未見形態上的差異。但DMD細胞倍增時間較正常細胞延長，提示DMD肌細胞增殖能力較低。在肌管 (Myotube) 形成期，DMD細胞融合時間延遲和低率的肌管融合，而已形成的有限的肌管，形態上短窄、缺乏多核的特點，顯示移植時，仍需用大量正常肌細胞改善。顯示培養技術在人體實驗之重要性，較之於動物移植仍有過之。

目前的問題在於如何改善肌胚細胞培養之量產及如何在移植後增加肌胚細胞之存活率，因而兩方面我們都想借助於中藥之療效。在本研究若先在動物實驗有成果，將進一步用於病人，將以中藥直接治療或配合肌胚細胞移植或基因療法進行之。後者將以中藥改善培養技術再進行。

肌胚細胞培養及移植在進行性肌萎縮症小鼠療效初步成果

本實驗室過去三年來，建立正常肌胚細胞培養之模式，與適合正常肌胚細胞移植的培養條件，包括正常肌胚細胞之純離，增殖及分化融合 (fusion) 的情形。實驗方法以對照組小鼠C57BL10/SCSN (以下簡稱B-10) 為正常肌胚細胞之來源，取2-3天新生之B-10小鼠之後肢骨骼肌分離出肌胚細胞進行1-7天的體外肌胚細胞培養。藉著操控一些分離肌胚細胞的技術及培養狀況，我們可得到純度約70%的肌胚細胞，其餘的細胞種類為纖維母細胞佔較多數。從肌胚細胞的生長動力學分析其增殖能力及倍增時間，並從細胞型態上的證據觀察肌胚細胞分化的能力，結果發現肌胚細胞的融合是隨著培養時間而漸進的；另外我們也以肌縮蛋白免疫染色不同培養時間內的肌胚細胞，顯示所分離出來的肌胚細胞是有能力融合且可產生肌縮蛋白的正常肌胚細胞，可作為肌胚細胞移植的細胞來源。關於肌胚細胞移植療法 (Myoblast Transfer

Therapy，以下簡稱MTT)方面，選擇45-60天大的MDX (muscular dystrophy murine)幼鼠，每隻MDX小鼠注射 1×10^6 細胞，MTT後每天持續皮下注射抗免疫排斥劑 Cyclo-sporine A (CsA)，與移植前肌肉切片比較，移植後肌肉切片出現肌縮蛋白顯示我們成功地將正常肌胚細胞移植入MDX小鼠內，並與病肌融合產生肌縮蛋白。同樣地我們目前的問題也在於如何改善肌胚細胞培養之產量，及如何在移植後增加肌胚細胞之存活率，兩方面我們也想借助於中藥之療效。

肌胚細胞移植療效之動物評估法—動作行為模式之建立

本模式在於探討肌縮蛋白 (dystrophin) 缺乏的MDX小鼠與肌縮蛋白正常的B-10小鼠運動活動功能的比較。並以肌胚母細胞移植療法(MTT)治療MDX小鼠後，觀察MDX小鼠運動活動量在移植前與後的改變情形。實驗方法是以動物活動量量化儀做為運動功能分析的儀器。將21天，45天，60天三個年齡層的B-10及MDX小鼠置於一個可以自由行為的偵測箱中，環境溫度控制在25-27°C，於夜間完全黑暗下偵測，每隻MDX小鼠均偵測60分鐘。接受肌胚細胞移植的MDX小鼠亦以同一方式偵測。統計結果發現MDX小鼠與C57BL/ScSn (簡稱B-10)小鼠的差別最重要的是垂直移動的各項數據。在活動量量化儀的十五項參數中，21天年齡層的B-10與MDX小鼠有12項有統計差異，而45天年齡層的B-10與MDX小鼠有七項顯示統計差異。在60天年齡層的B-10與MDX小鼠則僅有一項顯示統計差異。此項結果與MDX小鼠在早期(5星期)時肌肉會開始萎縮及再生有關，並支持此論點。另外，MDX小鼠會進行骨骼肌的功能再生的論點也在本結果中得到支持。在肌胚母細胞移植後的MDX小鼠的活動量則觀察得到有關於接受MTT的後肢肌肉的活動能力已有中等程度的改善。此種評估模式將用於動物實驗模式中藥治療效之評估。

進行性肌肉萎縮症之中藥治療之文獻回顧

進行性肌肉萎縮症在中醫文獻包括在痿症；痿症是以肢體筋脈弛緩，痿弱無力，甚至手不能握物，足不能任身，日久漸至肌肉萎縮，不能隨意運動為主要症狀的一類病證。又分脈痿、筋痿、肉痿、骨痿之不同(41,42,43,50)。金·劉完素〈素問玄機原病式·五運主病〉說：“痿，謂手足痿弱，無力以運行也。”；〈證治準繩·痿證〉說：“痿者手足痿軟而無力，百節緩縱而不收。”在臨床上則以下肢痿弱為常

見。西醫學中之多發性神經炎、急性脊炎、進行性肌萎縮症、重症肌無力症、周期性麻痹症、肌營養不良症和表現軟癱之中樞神經系統感染後遺症，皆屬於痿症。

痿症首出〈內經〉，〈素問·痿論篇〉詳論病因、病機、證候、鑒別及治法(42)。而在漢、晉、隋、唐時期則較少專題論述。北宋末年，陳無澤的〈三因極一病證方論·五痿敘論〉則直接指明：“痿證屬內、臟氣不足之所為也”(48)。明清以後，明；張景岳〈景岳全書·痿證〉(51)、清·葉天士〈臨證指南醫案·痿·鄒滋久按〉則指痿乃氣血精液不足。(52)

痿症之治療首重辨證施治，本計畫進行之肌源性肌肉萎縮症乃屬中醫“肉萎”，中醫認為本病皆因先天秉賦不足，腎精不足，不能養骨，腎元陽不足，則脾氣亦虛，運化失職，致水穀精微不能濡養四肢肌肉，因而造成肌肉萎縮(41,45,53)。治則以補虛養臟為主、滋陰益脾胃為輔(41,42,45,49,53)。本實驗選生黃耆、人蔘、枸杞、淮山及可興奮骨骼肌收縮張力之川七或其他可能有效之傳統中藥(魏湘：中成藥研究，1986，(2):26)(47)分別進行培養肌細胞與動物體之藥物投與(44,47)。

貳、材料與方法

(1) 中藥之配製：

中藥粉末溶於85°C熱水中、充份攪拌均勻。待冷卻後、以500 xg 離心3 min。取上層液以0.2μm針頭過濾器過濾，再以無菌二次蒸餾水稀釋至0.05 (g/ml) 及5 (g/ml)，存放於4°C備用。若用於活動量記錄實驗之口服用中藥，則免去過濾之程序，並將濃度調整為0.001g/ml。

MDX小鼠肌胚細胞之培養：從新生小鼠 (mice) 從其三頭肌取適量之骨骼肌做肌胚細胞之培養。切片、肌肉組織之取樣及肌細胞之培養，在本研究室已建立，其方法及常規步驟請參考本實驗室所發表之文獻(55)。培養後一週內其細胞數目達到6,000,000 cells以上時，即可進行實驗觀察。

(2) 中藥對肌胚細胞生長之影響：

由前述肌胚細胞培養方法所得之初代肌胚細胞，於60mm培養盤生長至趨飽和後，以trypsin分離至生長液中，以血球計數器計算細胞數目，並以含15%胎牛血清之生長液稀釋至60~70cells/mm²後，植於35mm培養盤中。待細胞附著及展開後，加入各種複方中藥，之後每隔24小時計算細胞數目，以cells/mm²為單位。連續紀錄4日(96小時)，以評估中藥對肌胚細胞生長之影響。實驗結果以ANOVA分析。

實驗前肌肉運動功能量化研究：使用動物活動量量化儀 (Optic Bean Activity Monitor, E61-32, Coulbourn) 記錄各組小鼠之運動活動量，方法如後所述 (56)。這些將做為給藥後再度評估時之比較。

動物活動量量化儀系統包括：

A. 偵測器 (Monitor)：

利用高解析度紅外光之矩陣式動物行為量測系統。此偵測系統於XYZ軸各設立16個紅外線偵測器。

B. 壓克力箱 (Acrylic cage)：透明的壓克力箱提供老鼠自由活動，長寬高分別為16.5", 16", 16.5"。

C. 系統分析控制器 (如 analyser)：將偵測的資料加以整理分析。

D. 移動軌跡記錄器 (Plotter)：老鼠移動的同時劃出移動的軌跡。

E. 資料列表機 (Printer)：將系統分析控制器整理分析後的結果列

出。資料形成的過程為由偵測器偵測，經由系統分析控制器整理出多項參數，最後由列表機將數據列出。而移動軌跡記錄器在實驗的同時將平面移動的軌跡畫出。動物活動量量化儀記錄的參數包括15項：

- (1) 水平活動量 (Horizontal activity)：水平偵測之紅外光被老鼠打斷的活動量。
- (2) 活動總距離 (Total distance)：老鼠所有水平活動的總距離，單位為公分，這更能代表老鼠步行活動量。
- (3) 水平活動次數 (No of movement)：當一次步行時間超過1秒以上才被記錄為1，設定時間內累計共有幾次這樣的記錄，稱為水平活動次數。
- (4) 活動總時間 (Movement times)：老鼠所有步行的時間稱活動所費總時間，但不包括重複動作的時間，單位為秒。
- (5) 休息時間 (Rest times)：設定時間內老鼠沒有移動的時間即休息時間。
- (6) 垂直活動量 (Vertical activity)：垂直偵測之紅外線被老鼠打斷的次數。
- (7) 垂直活動次數 (No of vertical movement)：當一次垂直活動時間超過1秒以上才被記錄為1，設定時間內累計共有幾次這樣的記錄，稱為垂直活動次數。老鼠的垂直活動為以後腳站立，抬起身體。
- (8) 垂直活動總時間 (Vertical times)：老鼠所有垂直活動的時間稱垂直活動總時間，單位為秒。
- (9) 重複動作量 (Stereotype count)：當老鼠重複打斷同一個紅外線偵測器則視為老鼠出現重複動作，重複動作量即代表同一紅外線偵測器被老鼠打斷的次數。常見的重複動作包括清洗動作、點頭動作等等。
- (10) 重複動作次數 (No of Stereotype)：當重複動作時間超過1秒以上才被記錄為1，設定時間內累計共有幾次這樣的記錄，稱為重複動作次數。
- (11) 重複動作總時間 (Stereotype time)：老鼠所有重複動作的時間稱重複動作總時間，單位為秒。
- (12) 繞圈運動 (Revolutions)：記錄老鼠做大於2英寸直徑順時針繞圈運動及逆時針繞圈運動的次數。
- (13) 停留邊緣時間 (Margin time)：老鼠停留在偵測壓力箱距離

牆緣1公分以內的時間。

(14) 停留中央時間 (Center time) : 老鼠停留在偵測壓克力箱距離牆緣1公分以外的時間。

(15) 停留角落時間 (Time spent in corners) : 老鼠停留在偵測箱兩個牆緣間的時間。又可分為前後左右四個角落。

行為偵測步驟：

進行行為偵測時，偵測環境需保持完全燈暗，並且實驗過程需保持在安靜無人及無其他噪音干擾的狀態，環境溫度控制在25-27°C，通風良好。在正式偵測前，老鼠先放於類似的安靜偵測環境，適應60分鐘。正式偵測的時間定為60分鐘，每隻老鼠只偵測1次，偵測結果每10分鐘記錄1次，即記錄6次（60分鐘）完成。偵測的同時軌跡記錄器將老鼠平面移停動的軌跡畫出，每10分鐘可得一平面移動圖形，60分鐘共得6張平面軌跡移動圖形。每次偵測結束後，皆須將偵測箱清洗乾淨並擦乾。將每隻老鼠一次偵測後的6次記錄結果，加以累計計算，共得15項參數指標：包括水平活動量、活動總距離、水平活動次數、活動總時間、休息時間、垂直活動量、垂直活動次數、垂直活動總時間、重複動作量、重複動作次數、重複動作耗時間、繞圈運動、停留邊緣時間、停留中央時間和停留角落時間等。其中繞圈運動包括順時針繞圈運動和逆時針繞圈運動；停留角落時間包括前左、前右、後左和後右四個角落的時間。

(3) 活動量記錄實驗 (Locomotor activity)

以年齡達60日大之MDX小鼠做為實驗動物。將MDX小鼠置於活動量記錄器中，以15項活動行為之記錄做為小鼠活動量化之指標。於餵食中藥前先行記錄一次活動量。爾後限制其飲水，每日只允許飲用6 ml 含中藥或 RO水之量，飲水時間為早上及傍晚各飲用3 ml。連續進行6日。第七日則充份供應 RO水。持續使其飲用中藥達3個月，其中每個月記錄活動量一次。實驗結果以二因子變異數分析 (2-way ANOVA) 評估複方中藥對活動量之影響。

參、結果

(1) 活動量記錄：

本研究於施用單方中藥3個月後，測量MDX小鼠在活動量記錄器中之行為記錄做為小鼠活動量化之指標。於各項分析指標中，擇其6項與肌肉張力有關的項目：移動距離、移動時間、移動次數、垂直活動量、垂直活動時間及垂直活動次數，於表一~表六顯示中藥對各分析指標之影響結果。會增進移動距離之中藥有黨蔘($F=19.05$, $p<.005$)、枸杞($F=8.5$, $p<.005$)、淮山($F=7.54$, $p<.05$)、黃耆($F=4.16$, $p<.05$)及川七($F=7.07$, $p<.05$)。對移動時間的分析則顯示有4種中藥對移動時間造成影響，分別為黨蔘($F=5.7$, $p<.005$)、枸杞($F=5.96$, $p<.05$)、淮山($F=5.36$, $p<.05$)、黃耆($F=4.74$, $p<.05$)。同樣的中藥對移動次數亦有增進的效果，黨蔘($F=4.58$, $p<.005$)、枸杞($F=8.1$, $p<.05$)、淮山($F=6.44$, $p<.05$)、黃耆($F=7.77$, $p<.05$)。其中枸杞($F=4.19$, $p<.05$)對垂直活動量具有明顯促進的效果。而洋蔘($F=4.8$, $p<.05$)及淮山($F=4.08$, $p<.05$)則會降低小鼠的垂直活動量。對垂直移動時間的分析則顯示，枸杞($F=11.75$, $p<.05$)會增加垂直移動的時間。小鼠的垂直活動次數則受到黨蔘($F=4.79$, $p<.005$)、枸杞($F=11.67$, $p<.005$)的促進作用。由於本實驗結果繁瑣，故以總整理顯示於表七。

(2) 中藥對肌胚細胞生長之影響

以六種中藥施用於生長液中觀察其對肌胚細胞生長的影響。其結果如圖一至圖六所示。除了淮山不顯著之外，其餘五種複方中藥對肌胚細胞的生長有促進的效果，如表八所示。

肆、討論

本模式之重點在於肌胚細胞的培養及繼代可大量供應移植所需之細胞，以供給DMD或BMD患者使用，已成目前治療DMD及BMD病症之一線希望。因此若能在本研究中對移植技術與評估方法做更進一步的改進，必能使臨床應用更為彰顯其效果，故本研究的重要性不僅是在實驗室內可提供肌細胞培養的改善方法，瞭解DMD及BMD之致病分生機轉，同時在臨床應用上也可提供更佳的移植模式，都將帶給DMD及BMD患者莫大的福祉。

垂直運動亦即站立的行為，咸信與後肢肌肉密切相關，因為小鼠在進行垂直運動時所運用的肌肉以伸肌為主，如臀大肌、股四頭肌等，而這些後肢肌肉在MDX小鼠的退化程度較其他肌肉嚴重。故本研究以垂直活動量、垂直活動次數與垂直活動時間的測量做為垂直運動能力之量化指標。本研究於施用中藥3個月後，發現生藥黨蔘與枸杞可增加垂直活動能力。若考慮以垂直活動量、垂直活動次數與垂直活動時間的測量指標必須三者同時顯著方有意義，則只有枸杞可增加垂直活動能力。

依據本研究室先前對MDX小鼠進行活動量量化儀的研究結果，發現活動量量化儀的15項評估指標中，除了垂直活動量、垂直活動次數與垂直活動時間的測量指標外，尚有移動距離、移動次數與移動時間足以做為MDX小鼠肌肉張力改善與否的指標（56）。針對此三項測量指標所評估之結果，顯示黨蔘、黃耆、淮山與枸杞具有顯著的增進效果。其中唯有枸杞在此六項測量指標均達顯著的增進效果。此結果是否有臨床上的意義，尚待更進一步的探討。

分析細胞培養之結果，發現洋蔘、黨蔘、黃耆、川七及枸杞處理後，均造成促進細胞生長的效果，而淮山卻無增進細胞生長的效果。有趣的是，洋蔘可增加細胞生長卻會降低垂直活動力。關於此點，必須從肌胚細胞之生長與分化的觀點進行探討。由於肌肉組織在胚胎時期是由肌胚細胞形成肌管後再融合為肌纖維，因此，其發展具有兩個時期：細胞生長時期與細胞融合期。如果細胞只能大量分裂卻無法形成肌管，將無助於肌肉纖維的生成，更遑論影響活動力，因此，是否洋蔘對於肌管形成無助益，而造成活動力降低，目前尚未可知。另一方面，雖無增進細胞生長及垂直運動能力的效果，卻可增進平面移動的水準。然而造成此結果的原因，雖可排除細胞增長而促進垂直運動能力的效果，但以我們現有的設備及經驗，尚無法區分淮山的作用是否與影響探索動機有關。

伍、結論與建議

本研究計畫重點在於嘗試以中藥來治療杜顯型及貝克型肌肉萎縮症。DMD及BMD由於基因缺陷導致肌肉內dystrophin缺乏，因此矯正基因缺陷和補充缺陷蛋白質成為本病的治療方針。由於基因療法的技術困難，需進一步研究。而細胞療法，即將肌胚細胞(myoblast)移植入病肌內，並使正當肌細胞與疾病肌細胞融合，恢復產生dystrophin能力成為探索本病治療的權宜新技術。目前的問題在於如何改善肌胚細胞培養之量產及如何在移植後增加肌胚細胞之存活率，因而我們提本研究計劃在上述兩方面我們都想借助於中藥之療效。

本研究以MDX小鼠做為研究材料，探討生藥對肌胚細胞生長以及MDX小鼠活動量之影響。在為期3個月的中藥投與後，發現枸杞可改善MDX小鼠垂直活動的表現，並且亦具有增進肌胚細胞生長的能力。其餘5種中藥無法在兩項實驗項目中均獲得改善的目的。由於本研究想借助於中藥之療效來治療杜顯型及貝克型肌肉萎縮症，因此中藥之來源由高雄市立中醫院代為購買。希望用於研究之生藥，其來源與功效已符合衛生署中醫藥委員會之GMP規範，方能夠和臨床使用者相接近。如此，實驗結果方能應用於第三年之臨床應用研究。

陸、参考文献

1. Bartlett AF, Sharp NJ, Hung WY, Kornegay JN & Roses AD. Molecular markers for myoblast transplantation in GRMD. *Adv Exp Med Biol* 280: 273-278, 1990.
2. Beauchamp JR, Abraham DJ, Bou-Gharios G, Partridge TA & Olsen I. Expression and function of heterotypic adhesion molecules during differentiation of human skeletal muscle in culture. *Am J Path* 140: 387-401, 1992.
3. Blau HM & Webster C. Isolation and characterization of human muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 78: 5623-5627, 1981.
4. Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Mendell JR, Moeley R, Miller JP & Province MA. Clin Inv in Duchenne dystrophy. Determination of the "power" of therapeutic trials based on the natural history. *Muscle Nerve* 6: 91-103, 1983.
5. Bulfield G, Siller WG, Wight PA & Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 81: 1189-1192, 1984.
6. Couillard M, Deschenes L & Tremblay JP. Cytomegalovirus and myoblast transplantation [letter]. *Lancet* 337: 1411, 1991.
7. Fowler WM & Gardner GW. Quantitative strength measurements in muscular dystrophy. *Arch Phys Med Rehabil* 48: 629-644, 1967.
8. Furlong TE. Myoblast transplantation [letter]. *Science* 257: 1329, 1992.
9. Gussoni E, Paviath GK, Lanctot AM, F'rrma KR, Miller RG, Steinman L & Blau HM. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 356: 435-438, 1992.
10. Griggs RC & Karpáti G. Myoblast transfer therapy. Plenum Press, pp 193-199, 1989.
11. Ham RG. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and cell lines. *Exp Cell Res* 29: 515, 1963.
12. Hanschka SD & Konigsberg IR. The development of muscle clones. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 55: 119, 1966.
13. Hanschka SD. Clonal analysis of vertebrate Myogenesis. 11 . Environmental influences on human muscle differentiation. *Dev Biol* 37: 329, 1974.
14. Hoffman EP. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 318: 136-138. 1978.

15. Hohlfeld R & Engel AG. Lysis of myotubes by alloreactive cytotoxic T cells and natural killer cells. Relevance to myoblast transplantation. *J Clin Inv* 86: 370-374, 1990.
16. Hohlfeld R & Engel AG. Induction of HLA-DR expression on human myoblasts with interferon-gamma. *Am J Path* 136: 503-508, 1990.
17. Huard J, Bouchard JP, Roy R, Labrecque C, Dansereau G, Lemieux B & Tremblay JP. Myoblast transplantation produce dystrophin-positive muscle fibres in a 16-year-old patient with Duchenne muscular dystrophy [letter]. *Clin Sci* 81: 287-288, 1991.
18. Huard J, Bouchard IP, Roy R, Malouin F, Dansereau G, Labrecque C, Albert N, fuchards CL & Lemieux B. Human myoblast transplantation preliminary results of 4 cases. *Muscle & Nerve* 15: 550-60, 1992.
19. Huard J, Roy R, Bouchard RP, Malouin F, Richards CL & Tremblay JP. Human myoblast transplantation between immuno-histocompatible donors and recipients produces immune reactions. *Transplan Pro* 24: 3049-3051, 1992.
20. Kakiilas BA, Howell J McC & Roses AD. Duchenne muscular dystrophy. Raven Press, 1992.
21. Karpati G. Nondystrophic myoblast transplantation into dystrophic muscle [letter, comment]. *Muscle & Nerve* 12: 337-339, 1989.
22. Kunkel LM & Hoffman EP. Duchenne/Becker muscular dystrophy, a short over-view of the gene, the protein, and current diagnostics. *Br Med Bul* 45: 630-643, 1989.
23. Kunkel LM. The dilemma of manifesting carriers in the context of myoblast transplantation. *Adv Exp Med Biol* 280: 285-286, 1990.
24. Labrecque C, Roy R & Tremblay JP. Immune reactions after myoblast transplantation in mouse muscles. *Transplan Proc* 24: 2889-2892, 1992.
25. Law PK, Goodwin TG, & Li HJ. Histoincompatible myoblast injection improves muscle structure and function of dystrophic mice. *Transplan Proc* 20: 1114-1119, 1988.
26. Law PK, Goodwin TG & Wang MG. Myoblast injections provided genetic treatment for murine dystrophy. *Muscle k Nerve* 11: 525-533, 1988.
27. Law PK. Dystrophin production induced by myoblast transfer therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* 336: 114-115, 1990.
28. Law PK. Myoblast transplantation [letter] . *Science* 257: 1329-1330, 1992.
29. Mantegazza R, Hughes SM, Mitchell D, Travis M, Blau IIM & Steinman L. Modulation of MHC class 11 antigen expression in human

- myoblasts after treatment with IFN-gamma. *Neurology* 41: 1 1128-1132, 1991.
30. Meola G, Tremblay JP, Sansone V, Rotondo G, Radice S, Bresolin N, Huard S & Scarlato G. Muscle glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency restoration of enzymatic activity in hybrid myotubes. *Muscle & Nerve*. 16: 594-600, 1993.
 31. Nicholson VB, Johnson MA, Gardner-Medwin D, Bhatlacharya S & Harris JB. Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 80: 239-250, 1990.
 32. Sharp NJ, Kornegay JN, Bartlett AI, Hung WY & Dykstra MJ. Neurotoxin-induced muscle injury in the dog. *J Neurol Sci* 116: 73-81, 1993.
 33. Rossiter BJ, Stirpe NS & Caskey CT. Report of the Gene Therapy Conference, Tucson, Arizona, September, 1991. *Neurology* 42: 1413-1418, 1992.
 34. Roy R, Tremblay JP, Huard J, Richards C, Malouin F & Bouchard IP. Antibody formation after myoblast transplantation in Duchenne dystrophic patients, donor HLA compatible. *Transplan Pro* 25: 995-7, 1993.
 35. Takemitsu M, Nonaka i, Arahata K, Ishiura S, Koga R & Sugita H. Advancement of the therapy for progressive muscular dystrophy experimental studies, Abstract, 1993.
 36. Tremblay JP, Roy B & Goulet M. Human myoblast transplantation a simple assay for tumorigenicity. *Neuromuscular Disorders* 1: 341-343, 1991.
 37. Vignos PJ. Physical models of rehabilitation in neuromuscular disease. *Muscle & Nerve* 6: 323-338, 1983.
 38. Lue YJ, Jong YJ, Lin YT & Chen SS. The strength and functional performance of patients with Duchenne muscular dystrophy based on natural history. *Kaohsiung J Med Sci* 8: 597-604, 1992.
 39. Ziter FA, Allsop KG & Tyler FH. Assessment of muscle strength in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 27: 981-984, 1977.
 40. 沈定國等。成肌細胞移植治療進行性肌營養不良症的初步研究。首屆海峽兩岸神經肌肉疾病研討會論文摘要。p.50, 1992.
 41. 醫宗金鑑 (文化圖書公司, 台北, 1976)
 42. 內經素問 (痿論篇, 戰國)

43. 內經素問 (生氣通天論篇, 戰國)
44. 中藥藥理學 (弘祥出版社, 台北, 1985)
45. 中醫內科學 (啓業書局, 台北, 1984)
46. 中醫方劑研究與應用大全 (中國科學技術出版社, 北京, 1995)
47. 中成藥研究 (魏湘, 1986)
48. 三因極一病證方論·五痿敘論 (陳無擇, 北宋末)
49. 儒門事親 (張子和, 金)
50. 丹溪心法 (朱丹溪, 清)
51. 景岳全書 (張介賓, 明, 1624)
52. 臨證指南醫案 (鄒滋九, 清, 1766)
53. 醫林改錯 (王清任, 清, 1830)
54. 湯頭歌訣 (汪昂, 清)
55. Jong JJ, Chen SS, Chuang YH & Chen TJ: Study of myoblast transfer therapy in dystrophic mice. Kaohsiung J Med Sci 11: 398-408, 1995.
56. Tseng WP, Leu YJ, Jong HJ, Chen TJ & Chen SS: Locomotion of dystrophin-deficient mice. Kaohsiung J Med Sci 11: 330-338, 1995.

表一、投與中藥對MDX小鼠垂直活動量之影響

Treat	n	Pretest	3 Month	F value	p
控制組	5	50.1±43.1	63.0±59.6		
洋蔘	5	59.0±57.8	25.0±20.1	4.80	< 0.05
黨蔘	4	28.3±14.1	68.6±68.5	1.29	
川七	5	39.4±24.1	53.7±31.8	0.005	
黃耆	5	64.0±44.0	58.4±35.6	0.79	
淮山	5	73.6±51.8	44.3±25.1	4.08	< 0.05
枸杞	5	48.1±30.4	105.4±55.1	4.19	< 0.05

The effects of oral administration of chinese herbal medicines for three months on locomotor activity of MDX mice. The *p* value listed indicates the statistical significance when compares to vertical activity at the end of the third month of water-drinking control group.

表二、投與中藥對MDX小鼠移動距離之影響

Treat	n	Pretest	3 Month	F value	p
控制組	5	1083.2±369.5	1150.3±433.6		
洋參	5	1115.5±403.1	1039.1±391.7	0.64	
黨參	4	952.5±225.0	2450.8±1305.7	19.05	< 0.005
川七	5	817.3±281.0	1332.0±403.7	7.07	< 0.05
黃耆	5	1098.9±381.7	1511.8±322.5	4.16	< 0.05
淮山	5	816.6±274.2	1485.2±747.9	7.54	<0.05
枸杞	5	1030.4±371.9	1878.8±985.9	8.5	< 0.005

The effects of oral administration of chinese herbal medicines for three months on locomotor activity of MDX mice. The *p* value listed indicates the statistical significance when compares to the moving distance at the end of the third month of water-drinking control group.

表三、投與中藥對MDX小鼠移動次數之影響

Treat	n	Pretest	3 Month	F value	p
控制組	5	127.6±21.9	116.5±29.0		
洋蔘	5	125.3±39.8	109.7±30.8	0.11	
黨蔘	4	110.9±25.5	126.3±27.6	4.58	< 0.05
川七	5	105.2±26.5	116.2±22.4	3.86	
黃耆	5	119.8±25.5	138.5±17.8	7.77	< 0.05
淮山	5	106.8±26.1	123.1±18.4	6.44	< 0.05
枸杞	5	118.6±24.4	137.0±15.2	8.1	<0.05

The effects of oral administration of chinese herbal medicines for three months on locomotor activity of MDX mice. The *p* value listed indicates the statistical significance when compares to the number of movements at the end of the third month of water-drinking control group.

表四、投與中藥對MDX小鼠移動時間之影響

Treat	n	Pretest	3 Month	F value	p
控制組	5	124.1±39.2	128.2±38.2		
洋蓐	5	118.0±38.1	107.6±43.8	1.21	
黨蓐	4	106.6±24.9	153.3±44.7	5.7	< 0.05
川七	5	89.35±33.3	123.8±45.8	2.96	
黃耆	5	121.5±40.3	162.1±31.7	4.74	< 0.05
淮山	5	95.4±32.8	135.6±28.2	5.36	< 0.05
枸杞	5	119.5±40.7	164.3±30.5	5.96	< 0.05

The effects of oral administration of chinese herbal medicines for three months on locomotor activity of MDX mice. The *p* value listed indicates the statistical significance when compares to movement time at the end of the third month of water-drinking control group.

表五、投與中藥對MDX小鼠垂直移動次數之影響

Treat	n	Pretest	3 Month	F value	p
控制組	5	19.8±14.2	16.4±11.9		
洋參	5	19.2±11.5	12.2±7.1	0.46	
黨參	4	12.9±6.1	21.8±13.1	4.79	< 0.05
川七	5	14.1±7.5	15.7±9.3	1.05	
黃耆	5	23.0±9.9	20.8±10.5	0.07	
淮山	5	20.4±11.0	17.9±7.2	0.03	
枸杞	5	17.4±8.9	32.9±14.0	11.67	< 0.005

The effects of oral administration of chinese herbal medicines for three months on locomotor activity of MDX mice. The *p* value listed indicates the statistical significance when compares to the number of vertical movements at the end of the third month of water-drinking control group.

表六、投與中藥對MDX小鼠垂直活動時間之影響

Treat	n	Pretest	3 Month	F value	p
控制組	5	12.1±10.9	10.4±10.0		
洋蔘	5	13.7±11.5	4.5±3.1	1.98	
黨蔘	4	5.5±3.6	16.1±12.2	3.94	
川七	5	7.0±5.1	11.1±7.7	1.71	
黃耆	5	12.2±9.9	10.7±6.1	0.0004	
淮山	5	17.1±13.8	11.0±8.6	0.72	
枸杞	5	9.2±6.1	29.8±22.7	11.75	< 0.005

The effects of oral administration of chinese herbal medicines for three months on locomotor activity of MDX mice. The *p* value listed indicates the statistical significance when compares to time of vertical movements at the end of the third month of water-drinking control group.

表七、中藥對 MDX 小鼠活動能力之影響 (總整理)

	洋蔘	黨蔘	黃耆	淮山	川七	枸杞
移動距離	--	↑↑	↑	↑	↑	↑↑
移動時間	--	↑	↑	↑	--	↑
移動次數	--	↑	↑	↑	--	↑
垂直活動量	↓	--	--	↓	--	↑
垂直移動時間	--	--	--	--	--	↑↑
垂直移動次數	--	↑	--	--	--	↑↑

The effects of oral administration of chinese herbal medicines for three months on locomotor activity of MDX mice at the end of the third month of water-drinking control group.

Double arrow ↑↑ indicates the facilitation effects reaches the statistical significance ($p < 0.005$).

Single arrow ↑ indicates the facilitation effects reaches the statistical significance ($p < 0.05$).

Single arrow ↓ indicates the inhibitory effects reaches the statistical significance ($p < 0.05$).

Dash -- indicates no statistical significance

表八、中藥對肌胚細胞生長之影響 (總整理)

中藥	劑量	N	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	F value
控制組	H ₂ O	6	81.3±8.8	124.8±9.7	180.1±14.2	320.1±14.7	517.8±24.3	
洋參	0.05 µg/ml	3	77.0±13.4	122.0±7.0	251.0±4.0	363.6±16.2	543.6±27.6	64.85 **
	5 µg/ml	3	78.0±1.7	116.0±9.6	216.6±17.2	301.3±10.0	498.3±9.0	5.42 *
黨參	0.05 µg/ml	3	74.0±6.0	120.0±13.5	224.3±15.8	437.0±6.2	577.3±27.0	97.6 **
	5 µg/ml	3	73.6±7.5	115.0±6.2	193.6±14.6	357.6±4.5	495.3±7.0	9.11 *
黃耆	0.05 µg/ml	3	79.3±5.1	121.0±7.0	228.6±14.2	401.3±15.9	563.3±24.5	94.52 **
	5 µg/ml	3	78.0±7.8	101.0±10.5	192.0±17.4	412.0±25.1	598.3±11.0	68.12 **
川七	0.05 µg/ml	3	81.6±7.2	119.0±11.1	265.3±7.3	450.3±15.3	423.3±22.3	48.9 **
	5 µg/ml	3	68.6±2.5	102.6±8.0	228.3±16.5	436.6±8.0	482.0±17.6	39.4 **
淮山	0.05 µg/ml	3	75.6±7.0	117.6±4.0	188.6±19.7	300.3±14.3	427.6±14.7	0.34
	5 µg/ml	3	76.3±6.5	127.3±4.0	160.3±4.1	221.3±17.2	389.3±17.0	0.37
枸杞	0.05 µg/ml	3	78.3±4.7	110.3±15.1	212.0±13.7	374.3±30.5	466.3±16.0	9.05 *
	5 µg/ml	3	81.6±5.5	114.0±15.6	203.0±18.0	418.6±7.0	548.3±6.8	75.00 **

The effects different concentrations of chinese herbal medicines on *in vitro* study of MDX mice primary myoblast cell counting.

Data listed in the way of mean ± SD indicates the cell number counted after 0、24、48、72、96 hours culturing session.

* indicates significant difference at $p < 0.05$

** indicates significant difference at $p < 0.005$